

Versuche
zur Physiologie der Knöllchenbildung bei
Pisum sativum L.

INAUGURAL-DISSERTATION

ZUR ERLANGUNG
DER PHILOSOPHISCHEN DOKTORWÜRDE
VORGELEGT DER
PHILOSOPHISCH-NATURWISSENSCHAFTLICHEN
FAKULTÄT
DER UNIVERSITÄT BASEL

VON

PETER EMANUEL RUDIN

AUS BASEL UND MUTTENZ

1 9 5 6

Druck von A. W. Hayn's Erben, Berlin West

Genehmigt von der Philosophisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
auf Antrag der

Herren Professoren Dr. M. GEIGER-HUBER

Dr. O. SCHÜEPP

Basel, den 21. Juni 1955

Prof. Dr. L. VONDERSCHMITT

Dekan



Aus der Botanischen Anstalt der Universität Basel

Direktor: Prof. Dr. M. Geiger-Huber

Versuche zur Physiologie der Knöllchenbildung bei *Pisum sativum* L.

Von

P. E. RUDIN

Mit 5 Abbildungen

Inhalt: Einleitung. — Methode. — Versuchsergebnisse: I. Versuche über die Bedeutung des Sprosses für die Knöllchenbildung. II. Einfluß des Lichtes auf die Knöllchenbildung an Erbsenwurzeln. a) Knöllchenbildung bei Beeinflussung des Sprosses durch Licht und Dunkelheit; b) Knöllchenbildung bei Belichtung der Wurzel. III. Morphologische Veränderungen des Wurzelsystems bei der Knöllchenbildung. — Zusammenfassung. — Literaturverzeichnis.

Einleitung

Wie alle Lebensprozesse, so ist auch die Knöllchenbildung an den Wurzeln der Leguminosen von Faktoren abhängig, die von außen und innen auf die höheren Pflanzen und die Bakterien einwirken (LEWIS und MC COY 1933). Die Knöllchen an den Leguminosen entstehen aus der gegenseitigen Beeinflussung zweier Organismen. Über diese Wechselbeziehungen wissen wir erst wenig: Man vermutet, daß die Rhizobien chemotaktisch geleitet in die Wurzelhaare der Leguminosen eindringen (THORNTON 1929), näheres darüber weiß man aber nicht. Im Innern der Pflanze regen die Bakterien das Wurzelgewebe an eng umgrenzten Stellen zu starker Vermehrung an, was dann zu den auch äußerlich sichtbaren Knöllchen führt. THIMANN (1936) nimmt an, daß Wirkstoffe, die von *Rhizobium* in der Wurzel ausgeschieden werden, die Zellvermehrung verursachen. Jedoch konnte L. BOND (1948 b) durch keinen der von ihr angewendeten Wirkstoffe die Rindenzellen der Wurzeln zur Vermehrung anregen. Man kann sich auch nicht recht vorstellen, wie die lokale Beschränkung der Zellvermehrung erfolgt und weshalb nicht das ganze Gewebe der Wurzelrinde sich vergrößert.

Die interessanteste Frage aber ist noch völlig ungelöst, weshalb nämlich nur die Leguminosen befähigt sind, mit *Rhizobium* die physiologisch so wichtigen Knöllchen zu bilden.

Je mehr man aber über die Faktoren weiß, die die Knöllchenbildung beeinflussen, um so eher kann man auch Rückschlüsse auf die noch verborgenen

Erscheinungen ziehen; darum ist mit der vorliegenden Arbeit versucht worden, die Kenntnis solcher Faktoren zu fördern.

Methode

Bei der Untersuchung der Frage nach den Beziehungen zwischen zwei Organismen — in diesem Falle zwischen Leguminosen und Knöllchenbakterien — ist es wesentlich, daß möglichst definierte Bedingungen vorliegen. Dazu gehören vor allem genaue Kenntnis des Substrats und Ausschließung anderer Organismen, da solche direkt oder indirekt auf die höheren Pflanzen oder die Bakterien einwirken können. Es ist daher aseptische Kultur der höheren Pflanzen und Reinkultur der Bakterien notwendig.

Um den Pflanzen immer gleiche Ernährungsbedingungen zu schaffen, wurden sie auf stickstofffreier Nährlösung nach KNOP gezogen. Sie hatte folgende Zusammensetzung: 0,25 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$, 0,25 g KH_2PO_4 , 0,7 g CaCl_2 , 0,25 g KCl, 3 Tropfen 5 % FeCl_3 , alles auf zwei Liter mit Leitungswasser aufgefüllt. Ähnliche Nährlösungen verwendeten NOBBE und HILTNER (1899), VIRTANEN (1928), VIRTANEN et al. (1933 und 1947), BOND, G. (1950), DIENER (1950).

Bei der Dampfsterilisation bildet sich in dieser Nährlösung ein ziemlich starker Niederschlag von Calciumphosphat, der störend wirken könnte. Um ihn möglichst zu vermeiden, wurde die Nährlösung vor dem Sterilisieren mit Salzsäure angesäuert und nachher mit steriler Natronlauge unter aseptischen Bedingungen so weit neutralisiert, daß eben ein ganz schwacher Niederschlag entstand; Messungen zeigten, daß das pH dann einen Wert zwischen 6,7 und 7 besaß. Da dabei Natrium- und Chlorionen zu der oben angegebenen stickstofffreien KNOP-Nährlösung kommen, so lassen sich die folgenden Resultate auch mit den Ergebnissen von Autoren vergleichen, die NaCl zu der Nährlösung gaben: VIRTANEN et al. (1931), LUDWIG und ALLISON (1937), SMITH (1949), BHADURI (1951).

LEWIS und MC COY (1933) fügten zu ihrer sonst ähnlichen Nährlösung außer NaCl noch CaCO_3 im Überschuß hinzu, so daß sie also einen Niederschlag enthielt; GÄUMANN et al. (1945) verwendeten KNOP-Nährlösung mit nur geringem Stickstoffgehalt.

Für die Kultur von *Rhizobium* wurde ein ähnlicher Nährboden verwendet, wie ihn VIRTANEN benützte. In der ursprünglichen Zusammensetzung hat der Nährboden den Nachteil, daß einige Bakterienstämme sehr viel zähe Schleimsubstanz bilden; indem nur die halbe Menge Mannit zugegeben wurde, konnte eine Verbesserung erreicht werden. Die Zusammensetzung war dann folgende: 100 ccm Hefewasser, 5 g Mannit, 0,2 g NaCl, 1 g K_2HPO_4 , 0,2 g MgSO_4 , 0,5 g CaCO_3 , 850 ccm Leitungswasser, 1½ % Agar. Durch Zugabe von CaCO_3 zeigt er neutrale Reaktion. Das Hefewasser wird folgendermaßen hergestellt: 20 g frische Bäckerhefe werden in 200 ccm Wasser suspendiert, 20 Minuten im Autoklaven bei 1 Atm. Überdruck gehalten und vom Filtrat die entsprechende Menge dem Nährboden zugefügt. Dieser wird in Kolleschalen abgefüllt und in üblicher Weise im Dampf sterilisiert. Ähn-

liche Substrate verwendeten PIETZ (1938), GEORGI und BEGUIN (1939), WEST und WILSON (1940), BHADURI (1951).

Aseptische Bedingungen bei der Kultur der höheren Pflanzen wurden dadurch zu erreichen gesucht, daß Pflanzenkeimlinge in sterile Nährlösung gesetzt und Knöllchenbakterien aseptisch zugegeben wurden. Sterilisieren und aseptisches Quellen der Samen erfolgte nach der Methode von BURLET (1940)¹); die Bromlösung war 1 : 1000 verdünnt, und die Samen blieben sieben bis zehn Minuten in der Lösung. Die Vorteile dieser Sterilisationsmethode sind: Gute Entfernung von Brom und CO₂ durch Luftstrom, Zufuhr von O₂, Überdruck.

Nach zwei Tagen, wenn alle Samen gequollen waren, wurden sie aseptisch in sterile Keimröhrchen gesetzt; dies sind wenig oberhalb der Mitte ausgezogene Reagenzröhrchen mit starker Wandung, die mit Streifchen von ungeleimtem, saugfähigem Papier (z. B. unbedrucktem Zeitungspapier) und etwa 10 ccm Leitungswasser versehen sind. Sie werden mit einem Wattestopfen verschlossen und im Dampftopf sterilisiert. Die Samen wurden in Thermostaten bei 28 bis 29° C auskeimen gelassen. Hatten die Keimlinge eine Wurzel von etwa 8 cm Länge, so wurden sie auf mit 200 ccm der oben angegebenen Nährlösung versehene Fernbachkolben gesetzt. Die jungen Pflänzchen wurden dabei aseptisch in die aus sterilen Wattelagen bestehenden und etwas kürzer als üblich geschnittenen Wattezapfen gewickelt, die dann die Fernbachkolben verschließen; die Wurzeln tauchten in diesem Zeitpunkt schon in die Nährlösung ein. Die Kolben hielt man im Gewächshaus bei 18 bis 25° C, umgab sie aber mit dünner Aluminiumfolie, damit sich die Wurzeln im Dunkeln befanden und zudem die Wärmestrahlen reflektiert wurden. Für andere Versuche wurden die Pflanzen in einer Dunkelkammer bei 20° C kultiviert. Dank der relativ großen Oberfläche der Nährlösung, einer Schichthöhe von nur etwa 2 cm, dem Verbrauch der Nährlösung und dank dem Luftwechsel infolge temperaturbedingter Volumenänderung der Luft im Kolben (VIRTANEN et al. 1931), war die Luftzufuhr zu den Wurzeln genügend. Unter solchen Bedingungen wuchsen die Pflanzen stets gut weiter. Wenn das Wurzelwerk stark genug entwickelt war, erfolgte aseptische Zugabe der Knöllchenbakterien; die verwendeten Bakterienkulturen waren bis zu diesem Zeitpunkt etwa acht bis zwölf Tage im Dunkeln bei Zimmertemperatur gehalten worden. Die Bakteriensuspension wurde hergestellt, indem in die Kolleschalen 20 ccm steriles Wasser gegeben und mit einem sterilen Glasspatel die Bakterienkulturen abgelöst wurden. Diese hafteten wegen ihrer zäh-schleimigen Konsistenz stark an der Unterlage. Die aus verschiedenen Schalen gewonnenen Suspensionen wurden in einem keimfreien Erlenmeyerkolben gesammelt, während längerer Zeit gründlich geschüttelt, um eine möglichst homogene Suspension zu erhalten, und dann mit steriler

¹) STOLP (1952) beschreibt eingehend „seine“ hierzu verwendete Apparatur und erläutert ihre Vorteile, ohne auf BURLET (1940) hinzuweisen, obwohl sie in allen wesentlichen Teilen genau derjenigen von BURLET (1940, Abb. 2) nachgebildet ist und nur statt Gummiverbindungen solche aus Glas besitzt, und obschon die Vorteile dieser Anordnung schon von BURLET klar angegeben sind.

Pipette den Leguminosen-Kulturen zugegeben. Für je sechs bis sieben Pflanzen wurden die Bakterien einer Kolleschale verwendet und je Pflanze 3 ccm Suspension zugegeben. Dieser ganze Arbeitsvorgang wird im folgenden kurz als „Impfen“ bezeichnet. BHADURI (1951) stellte fest, daß die Anzahl der Knöllchen bei *Phaseolus radiatus* var. *aurea* von der Menge der zugegebenen Bakterien abhängt: An den Wurzeln entstanden viel Knöllchen, wenn etwa 10^5 bis 10^6 , wenig Knöllchen, wenn nur 10^2 bis 10^4 Bakterien je ccm zugegeben wurden; innerhalb dieser beiden Gruppen traten keine signifikanten Unterschiede auf. Eigene Versuche an Erbsen ergaben, daß innerhalb gewisser Grenzen die Knöllchenbildung unabhängig von der Anzahl der zugegebenen Bakterien ist (Tabelle 1). Die Knöllchenbildung wird also offenbar vor allem von der höheren Pflanze beherrscht, da selbst viele Bakterien diese nicht etwa veranlassen, viele Knöllchen zu bilden.

Tabelle 1

Versuch 80 und 130: Knöllchenbildung bei *Pisum sativum* L. und Menge der zugegebenen Bakterien

Versuchszeit I: 23. Mai bis 27. Juni, Versuchszeit II: 14. Oktober bis 17. November

Gruppe	Anzahl Pflanzen		Bakt. susp. ccm		Knöllchen je Pflanze	
	I	II	I	II	I	II
A	6		2		81 ± 28	
B		8		3		64 ± 23
C	7		4		87 ± 18	
D	6	8	6	6	81 ± 34	68 ± 21
E		8		12		69 ± 14

Wenn die Pflanzen am Licht wuchsen, so erschienen etwa sechs Tage nach dem Impfen die ersten Knöllchen. Diese zeigten schon äußerlich eine hellrote Farbe von Leghaemoglobin, die an aufgeschnittenen Knöllchen noch stärker sichtbar war. Nach etwa 35 Tagen wurden die Versuche abgebrochen und ausgewertet in bezug auf Anzahl, Größe und Farbe der Knöllchen, Aussehen und Trockengewicht der ganzen Pflanze und Länge des Sprosses.

Die statistische Auswertung der Resultate erfolgte nach dem t-Test unter Verwendung der Tafeln von FISHER und YATES (1953). Bei den verschiedenen Versuchen wurden verschieden viele Pflanzen ausgewertet, wobei gleichbehandelte Pflanzen zu Gruppen zusammengefaßt wurden. Diese stellten Stichproben zu n Elementen dar. Innerhalb derselben wurden die Stichprobenmittelwerte (z. B. Anzahl Knöllchen, Trockengewicht, Sproßlänge) nach der Formel

$$\bar{x} = \frac{x_1 + x_2 + \dots + x_n}{n}$$

und die Stichprobenstreuungen nach der Formel

$$s^2 = \frac{(x_1 - \bar{x})^2 + (x_2 - \bar{x})^2 + \dots + (x_n - \bar{x})^2}{n}$$

berechnet.

Für den Vergleich von zwei Gruppen erhielten wir die Gesamtstreuung aus der Formel

$$\sigma = \sqrt{\frac{n \cdot s'^2 + m \cdot s''^2}{n + m - 2}}.$$

n und m bedeuten die Anzahl der Elemente je Gruppe.

Der Testgröße t kommt folgende Formel zu:

$$t = \frac{\bar{x}' - \bar{x}''}{\sigma \cdot \sqrt{\frac{1}{n} + \frac{1}{m}}}$$

$\bar{x}' - \bar{x}''$ stellt die Differenz zwischen den Mittelwerten der zwei zu vergleichenden Gruppen dar. Aus den Tafeln läßt sich nun eine Größe P als Wert von 0 bis 1 ablesen; P ist die Wahrscheinlichkeit dafür, daß der zu betrachtende Mittelwert zur gleichen Gesamtheit gehört wie der Wert der Kontrollpflanzen. Ist P kleiner als 0,05, so wurden die Werte als signifikant different betrachtet.

Als Versuchspflanze diente *Pisum sativum* L., Sorte „Senator“, *Phaseolus vulgaris* L., Sorte Buschbohnen „Wädenswil“, *Lupinus angustifolius* L. und *Zea Mays* L.

Die Pflanzen wurden mit folgenden Stämmen von *Rhizobium* geimpft: *Rhizobium leguminosarum* Frank, Stamm H 47 von Prof. VIRTANEN, Helsinki, und Stamm „Senator“; *Rhizobium phaseoli* Dangard, Stamm „Saxa“, beide hier isoliert. Die Unterscheidung dieser Arten oder Rassen wurde nach BREED, MURRAY und HITCHENS „BERGEY's Manual of Determinative Bacteriology“, 6. Auflage, 1948, vorgenommen. Allerdings scheint mir die Abgrenzung nicht streng durchführbar zu sein, da Bohnenpflanzen auch Knöllchen bildeten, wenn sie mit dem einen oder anderen Erbsenbakterienstamm geimpft wurden; auch Erbsenpflanzen bildeten Knöllchen, verursacht durch die Bohnenbakterien.

Pflanzen, die unter solchen Bedingungen wuchsen, wie sie in diesem Kapitel über die Methode beschrieben wurden (Nährlösung, aseptische Bedingungen, Sproß belichtet, Wurzel verdunkelt, Zugabe der auf bestimmtem Nährboden gewachsenen Bakterien), dienten als Kontrollpflanzen; in den Tabellen werden sie mit K bezeichnet.

V Versuchsergebnisse

I. Versuche über die Bedeutung des Sprosses für die Knöllchenbildung

Versuche, an isolierten Erbsenwurzeln Knöllchen zu erzeugen, führten nie zu einem Ergebnis; die Wurzeln, die in keimfreier Organkultur nach der Methode von GEIGER-HUBER und BURLET (1936), BONNER und ADDICOTT (1937) und BURLET (1940) gezüchtet wurden, wuchsen zwar gut, aber es traten niemals Knöllchen auf. Nicht einmal, wenn ganze Erbsenpflanzen, aber vollkommen in Fernbachkolben eingeschlossen, kultiviert wurden, kam es zu so guter Knöllchenbildung wie bei Pflanzen, die mit den Wurzeln in steriler Nährlösung, mit dem grünen Sproß aber in der freien Luft wuchsen; der Sproß hatte allerdings wegen des begrenzten Raumes

in den Fernbachkolben nicht die Möglichkeit zur vollen Entfaltung. Der Erbsensproß muß sich also offenbar physiologisch in einem optimalen Zustand befinden, damit es an seinen Wurzeln zur Knöllchenbildung kommen kann. Es ergibt sich damit ein ganzer Fragenkomplex: Ist zur Knöllchenbildung eine bestimmte quantitative Änderung des physiologischen Zustandes Voraussetzung, derart, daß Knöllchenbildung bedingende Stoffe in geeigneter Menge vorhanden sein müssen? Oder ist eine qualitative Änderung notwendig, indem gewisse erforderliche Stoffe (z. B. im Sproß) gebildet werden müssen oder andere schädliche Stoffe (z. B. Stoffwechselprodukte der isolierten Wurzeln) verschwinden sollten?

Weitere Versuche bestätigten den Unterschied im Verhalten von isolierten Wurzeln und Wurzeln an grünen, vollentwickelten Pflanzen in bezug auf die Knöllchenbildung: Wurden gut entwickelten, zehn Tage alten Pflanzen gleichzeitig mit dem Impfen die Sprosse weggeschnitten, so blieb die Knöllchenbildung aus. Das so isolierte Wurzelsystem starb nicht ab, wenn der Sproß weggenommen wurde, im Gegenteil, es wuchs sogar noch weiter, wenn auch natürlich in geringem Maße; während einer Versuchsdauer von etwa 30 Tagen mußten sogar zwei- bis viermal neu austreibende Sproßknospen abgeschnitten werden, ein Zeichen für die volle Lebensfähigkeit des übriggebliebenen Organs. Wurzelsysteme ohne Sproß bilden keine Knöllchen; der grüne, belichtete, vollentwickelte Sproß hat grundlegende Bedeutung für die Knöllchenbildung.

Es entstand nun die Frage, ob der Einfluß des Sprosses ersetzt werden könnte durch die Zugabe eines Organs oder eines Stoffes. Bei einem ersten Versuch in dieser Richtung wurde der Erbse der Sproß abgeschnitten und aseptisch so zur Wurzelkultur gegeben, daß die Schnittfläche des Sprosses in die Nährlösung tauchte; der obere Sproßteil ragte aus dem Kolben heraus ins Licht, so daß er assimilieren konnte. Diesem Versuch lag die Vorstellung zugrunde, daß durch die Schnittstelle Assimilations- und Stoffwechselprodukte, die der übriggebliebenen Wurzel offenbar fehlen, in die Nährlösung austreten und an der Wurzel Knöllchenbildung ermöglichen könnten. Da ja Kohlenhydrate die Ursache für die Knöllchenbildung sein sollen (L. BOND 1948 a; LEWIS, Mc COY 1933), wäre eine solche Wirkung denkbar. Die Wurzeln bildeten jedoch auch unter diesen Bedingungen keine Knöllchen. Die beigesteckten Sprosse konnten offenbar keine oder nicht genügend Stoffe ausscheiden, denn an der Schnittstelle entstand ein Kallusgewebe und aus ihm Adventivwurzeln. Diese bildeten nun aber ihrerseits Knöllchen (Abb. 1). Dies kann als Beweis dienen, daß die zugegebenen Bakterien voll infektiösfähig und die Sproßstecklinge zur Ermöglichung der Knöllchenbildung imstande waren. Verhinderte man die Bildung der Adventivwurzeln, indem am Sproß ungefähr alle zwei Tage die Schnittstelle erneuert wurde, so hatten zwar die Assimilationsprodukte wohl eher Gelegenheit, während längerer Zeit auszutreten, aber es kam doch nicht zur Knöllchenbildung am isolierten Wurzelsystem.

Statt mit einem ganzen Sproß wurde versucht, die isolierte Wurzel mit einem wässerigen Extrakt des Sprosses zu beeinflussen. Je 20 g grüne Sprosse von etwa 15 Tage lang auf Torf-Sand gewachsenen Erbsenpflanzen wurden abgeschnitten, gewogen, in einem Eiswasserbad mit Quarzsand zerrieben, mit 100 ccm Eiswasser gemischt, während etwa zwölf Stunden bei etwa 5°C extrahiert, abfiltriert und 0,1 bis 10 ccm je zu einer Wurzel gegeben. Dieser Extrakt ließ jedoch keine Knöllchen an den isolierten Wurzeln entstehen.

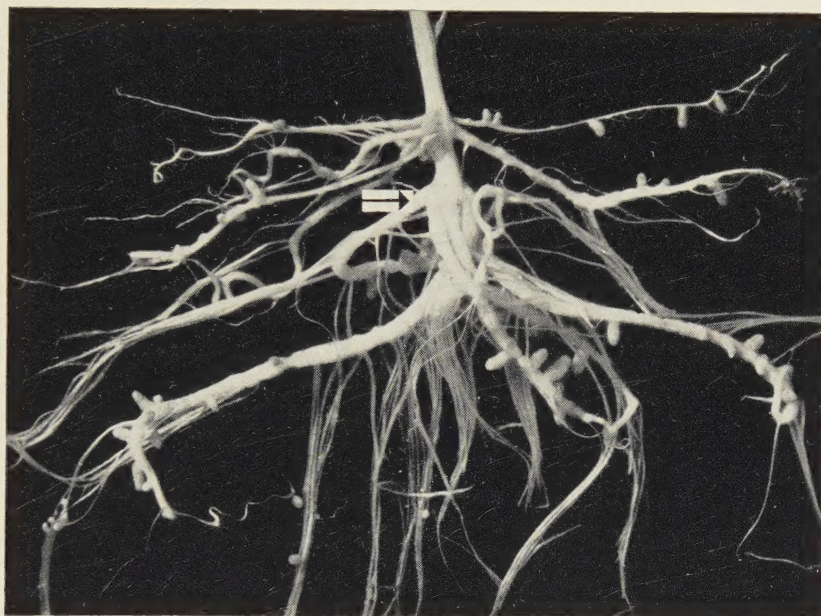


Abb. 1. Knöllchenbildung an Adventivwurzeln von Erbsenstecklingen.
→ Schnittstelle

Um zu sehen, ob ein solcher Extrakt vielleicht die Knöllchenbildung an g a n z e n , grünen, am Licht gewachsenen Erbsenpflanzen beeinflußt, wurde ein gleich hergestellter Auszug, in gleichen Konzentrationen wie oben beschrieben, gleichzeitig mit den Bakterien zugegeben. Wie Tabelle 2 zeigt, konnte dadurch die Knöllchenbildung gefördert werden; es müssen also wohl in einem solchen Sproßextrakt Stoffe vorhanden sein, die mit der Knöllchenbildung in direktem oder indirektem Zusammenhang stehen. Es ist möglich, daß durch die Extraktstoffe zuerst die Pflanze gefördert wird und erst dadurch in vermehrtem Maße Knöllchen entstehen. Aus Tabelle 2 ist nämlich ersichtlich, daß Längenwachstum des Sprosses und Trockengewicht etwas gefördert werden gegenüber der Kontrolle ohne Sproßextrakt. Welches nun aber der primäre und welches der sekundäre Vorgang ist, läßt sich nicht erkennen.

Tabelle 2

Versuch 89: Einfluß von wässerigem Extrakt aus grünem Sproß von *Pisum* auf die Knöllchenbildung bei *Pisum sativum* L.

Versuchszeit: 22. Februar bis 26. März

Gruppe	Anzahl Pflanzen	Extrakt ccm/200 ccm Nährlösung	Knöllchen je Pflanze	t	P	Sproßlänge cm	t	P	Trockengewicht der Pflanz. mg	t	P
K	12	0	107 ± 39	—	—	47 ± 6	—	—	449 ± 105	—	—
A	12 ¹⁾	0,1	131 ± 37	1,47	0,17	50 ± 3	1,57	0,15	479 ± 60	0,80	0,40
B	12 ¹⁾	0,5	128 ± 35	1,32	0,20	49 ± 2	1,1	0,30	498 ± 69	1,25	0,25
C	12	1	113 ± 22	0,45	0,65	49 ± 4	0,98	0,35	447 ± 82	0,05	1,0
D	11	2	141 ± 31	2,19	0,04	55 ± 12	2,31	0,03	512 ± 62	1,66	0,15

1) Für Trockengewicht nur elf Pflanzen.

In Tabelle 3 sind alle Wiederholungen dieses Versuches zusammengefaßt. Es ist daraus erneut ersichtlich, daß Zugabe von 0,1 bis 2 ccm Extrakt je Pflanze eine Förderung der Knöllchenbildung bewirkt.

Wird ein solcher Extrakt von grünen *Pisum*-Sprossen durch Talkum filtriert, so daß also die Protoplasten zurückgehalten werden, so bleibt die Förderung doch erhalten; bei Zugabe von 1 ccm Extrakt entstanden 108 ± 36 Knöllchen je Pflanze gegenüber 65 ± 15 bei den Kontrollpflanzen ($P = 0,04$).

Tabelle 3

Zusammenfassung der Resultate der durch Zugabe von Erbsensproßextrakt beeinflussten Knöllchenbildung von *Pisum sativum* L. (Versuche 26, 29, 37, 89, 93, 122)

Anzahl Pflz.	Menge Extrakt je Pfl. ccm	Knöllchen je Pflanze	t	P
44	0	77 ± 42	—	—
5	0,01	59 ± 12	0,94	0,40
44	0,1	99 ± 54	2,20	0,04
25	0,5	93 ± 48	1,42	0,15
43	1	112 ± 66	3,18	0,01
24	2	110 ± 49	3,00	0,01
5	3	83 ± 67	0,27	0,8
5	4	60 ± 30	0,85	0,4
16	5	91 ± 43	1,09	0,3
12	10	64 ± 34	0,93	0,4
5	20	77 ± 60	0	1,0

Der wirksame Stoff (oder Stoffgemisch) ist also wasserlöslich; ob er in wässriger Lösung mit der Zeit zerfällt, konnte nicht eindeutig festgestellt werden. Wird die gleiche Menge Sproßmaterial, wie sie für den frischen Extrakt aus grünen Sprossen Verwendung fand (20 g je 100 ccm), bei 40 °C im Vakuumschrank getrocknet (2,16 g Trockensubstanz), so wurde die Knöllchenbildung bei Zugabe von 10 ccm Extrakt je Pflanze gefördert: Die Kontrollpflanzen hatten 83 ± 11 Knöllchen, bei Zugabe von 10 ccm Extrakt entstanden 143 ± 15 Knöllchen je Pflanze; kleinere Zugaben hatten keinen Einfluß.

Beim Erhitzen des Extraktes sowohl im strömenden Dampf während einer Stunde als auch im Autoklaven während 20 Minuten bei 1,5 Atm. Überdruck verschwand jedoch seine Fähigkeit, die Knöllchenbildung zu fördern; statt dessen trat bei Zugabe von 20 ccm Extrakt je Pflanze sogar

eine signifikante Hemmung auf (Tabelle 4). Auch wenn der Extrakt als saurer Auszug (pH 0,1) mit verdünnter Schwefelsäure hergestellt, im Kühlschrank ($\pm 5^{\circ}\text{C}$) zwölf Stunden stehengelassen und dann mit Natriumhydroxyd neutralisiert wurde (pH 6,8), gab es keine Förderung.

Tabelle 4

Versuch 39 und 50: Wirkung von auf etwa 96°C und 125°C erhitztem wässerigem Erbsensproßextrakt auf die Knöllchenbildung bei *Pisum sativum* L.

Versuchszeit bei 96°C : 11. August bis 12. September, bei 125°C : 6. Oktober bis 10. November

Gruppe	Extrakt ccm	Extrakt auf 96°C erhitzt				Extrakt auf 125°C erhitzt			
		Anzahl Pflz.	Knöllchen je Pflanze	t	P	Anzahl Pflz.	Knöllchen je Pflanze	t	P
K	0	6	69 ± 19	—	—	5	38 ± 15	—	—
A	0,1	6	82 ± 36	0,75	0,50	5	46 ± 19	0,66	0,60
B	1	6	65 ± 19	0,33	0,80	5	55 ± 36	0,87	0,40
C	5	6	54 ± 18	1,30	0,30	5	35 ± 9	0,34	0,70
D	10	6	90 ± 29	1,35	0,20	5	36 ± 16	0,17	0,80
E	20	5	21 ± 18	4,17	0,003	5	12 ± 11	2,75	0,03

Aus Erbsen s a m e n (20 g gequollene Samen in 100 ccm Eiswasser zerrieben) ließ sich kein Stoff extrahieren, der auf die Knöllchenbildung einen erkennbaren Einfluß hatte.

Tabelle 5

Versuch 126: Einfluß wässerigen Erbsenwurzelextraktes auf die Knöllchenbildung von *Pisum sativum* L., Sorte „Senator“

Versuchszeit: 28. September bis 4. November

Gruppe	Anzahl Pflanz-	Extrakt ccm/ 200 ccm Nährlösung	Knöllchen je Pflanze	t		Sproßlänge cm	t		Trockengewicht der Pflanz. mg	t	
				t	P		t	P		t	P
K	10	0	75 ± 27	—	—	47 ± 4	—	—	513 ± 79	—	—
A	5	3	129 ± 29	3,28	0,01	54 ± 3	3,12	0,01	642 ± 54	2,98	0,02
B	4	5	131 ± 27	3,28	0,01	55 ± 2	3,34	0,01	563 ± 30	1,12	0,30
C	5	7	96 ± 23	1,36	0,20	54 ± 4	3,12	0,01	550 ± 47	0,88	0,40

Eine eindeutige Förderung ergab sich auch mit einem wässerigen Auszug aus Wurzeln ganzer *Pisum*-Pflanzen (Tabelle 5). An den für den Extrakt verwendeten Wurzeln waren Knöllchen vorhanden, die mitverwendet wurden. Bereits Zugabe von 3 ccm und 5 ccm ergab eine eindeutige Förderung ($P = 0,01$). Auch das Längenwachstum und die Vermehrung der Trockensubstanz wurden parallel mit der Knöllchenbildung gefördert. Extrakt aus getrockneten *Pisum*-Wurzeln vermochte die Knöllchenbildung nicht mehr zu beeinflussen. Bei der Suche nach anderen Leguminosen, deren Extrakt eine Wirkung auf die Knöllchenbildung bei *Pisum* haben könnte, waren keine eindeutigen Resultate zu erzielen. Wohl förderte ein Extrakt aus Sprossen von *Phaseolus* bei Zugabe von 5 ccm die Knöllchen-

bildung (Kontrolle: 65 ± 16 ; 5 ccm Extrakt 118 ± 17 ; $P = 0,01$); andere Zugaben (0,1; 1; 10 ccm) hatten aber keinen Einfluß. Zugabe von Extrakten aus Wurzeln von *Phaseolus* und Sprossen und Wurzeln von *Lupinus* führten

zu keiner Steigerung der Knöllchenbildung.

Tabelle 6

Versuch 48: Einfluß eines wässrigen Maissproßextraktes auf die Knöllchenbildung bei *Pisum sativum* L.

Versuchszeit: 22. September bis 3. November

Gruppe	Anzahl Pflanzen	Extrakt ccm/ 200 ccm Nährlösung	Knöllchen je Pflanze	t	P
K	6	0	41 ± 13	—	—
A	6	0,1	55 ± 16	1,51	0,15
B	6	1	72 ± 20	2,98	0,015
C	6	5	75 ± 17	3,46	0,008
D	6	10	64 ± 24	1,89	0,10

Tabelle 7

Versuch 105: Einfluß eines wässrigen Wurzelextraktes von *Zea Mays* auf die Knöllchenbildung von *Pisum sativum* L.

Versuchszeit: 3. Juni bis 6. Juli

Gruppe	Anzahl Pflanzen	Extrakt ccm/ 200 ccm Nährlösung	Knöllchen je Pflanze	t	P
K	6	0	69 ± 18	—	—
A	6	1	75 ± 23	0,45	0,65
B	6	5	91 ± 28	1,49	0,17
C	6	10	121 ± 45	2,41	0,04

Unerwartet war das Ergebnis der in den Tabellen 6 und 7 dargestellten Versuche: Extrakte von Sprossen und Wurzeln von *Zea Mays* förderten die Knöllchenbildung bei *Pisum*. Der gleich wie Erbsensproßextrakt (S. 63) hergestellte Maisextrakt wurde aus zwei Tage gequollenen und zehn Tage auf Torf-

Sand gewachsenen Maispflanzen gewonnen. *Zea Mays* wurde willkürlich als Vertreter der Nicht-Leguminosen gewählt. Dieses Ergebnis schließt die ursprüngliche Vermutung aus, daß es

sich bei den biologisch nachgewiesenen Stoffen, die eine Förderung der Knöllchenbildung verursachen, um den Leguminosen spezifische Stoffe handle. Hingegen scheint sicher, daß es sich um einen Wirkstoff (oder Wirkstoffe) und nicht um einen Nährstoff handelt, denn die fördernde Extraktmenge beträgt immer rund 2 ccm oder $\frac{1}{50}$ des Ausgangsmaterials. Vergegenwärtigt man sich, daß die frischen Erbsensprosse zu etwa 90 % aus Wasser bestehen (S. 64) und von den restlichen 10 % nur wasserlösliche Stoffe zur Wirkung kommen, so handelt es sich um sehr geringe Mengen, die die Steigerung der Knöllchenbildung bewirken. DIENER (1950) konnte die Knöllchenbildung durch Phosphor- und Stickstoffzugabe fördern; die von ihm gefundenen günstigsten Salzkonzentrationen liegen aber fünfmal höher als die gesamte Trockensubstanz der optimal wirkenden Extraktmenge.

Bei den bisher beschriebenen Versuchen mit Sproßextrakten wurde nicht darauf geachtet, ob die für den Extrakt verwendeten Sprosse von Pflanzen stammten, an denen Knöllchen vorhanden waren. Hingegen wurden an den Wurzeln, die für den Wurzelextrakt Verwendung

Tabelle 8

Versuch 118 und 122: Einfluß von Sproßextrakt aus sterilen und aus mit *Rhizobium* beimpften Erbsenpflanzen auf die Knöllchenbildung bei *Pisum sativum* L.

Versuchszeit I: 26. August bis 29. September. II: 8. September bis 13. Oktober

Gruppe	Extrakt ccm/ 200 ccm Nährlösung	I steril				II beimpft, mit Knöllchen			
		Anzahl Pflanzen	Knöllchen je Pflanze	t	P	Anzahl Pflanzen	Knöllchen je Pflanze	t	P
K	0	6	65 ± 21	—	—	6	42 ± 17	—	—
A	0,1	6	72 ± 15	0,61	0,90	6	57 ± 18	1,37	0,20
B	0,5	5	59 ± 21	0,43	0,90	6	42 ± 13	—	—
C	1	4	69 ± 22	0,26	0,90	6	68 ± 21	2,15	0,06
D	5	4	49 ± 16	1,13	0,30	4	69 ± 20	2,0	0,08

Tabelle 9

Versuch 119 und 123: Einfluß von Wurzelextrakt aus sterilen und aus mit *Rhizobium* beimpften Erbsenpflanzen auf die Knöllchenbildung bei *Pisum sativum* L.

Versuchszeit I: 26. August bis 30. September. II: 21. Oktober bis 30. November

Gruppe	Extrakt ccm/ 200 ccm Nährlösung	I steril				II beimpft, mit Knöllchen			
		Anzahl Pflanzen	Knöllchen je Pflanze	t	P	Anzahl Pflanzen	Knöllchen je Pflanze	t	P
K	0	5	51 ± 10	—	—	8	49 ± 21	—	—
A	2	4	55 ± 11	0,495	0,65	8	70 ± 14	2,21	0,045
B	5	4	51 ± 10	—	—	8	51 ± 26	—	—
C	10	4	52 ± 14	—	—	8	73 ± 32	1,65	0,10

fanden, Knöllchen festgestellt (S. 65). Haben nun die an den Extrakt-pflanzen vorhandenen Knöllchen eine Bedeutung für die fördernde Wirkung der Extrakte oder nicht? Dieser Frage galten die folgenden Versuche. Die Erbsenpflanzen für den Extrakt wurden statt wie bisher auf Torf-Sand aseptisch in Nährlösung gezogen und die eine Hälfte der Pflanzen mit *Rhizobium* beimpft. Diese Pflanzen wurden erst verwendet, wenn die gebildeten Knöllchen gut sichtbar waren, d. h. zehn Tage nach Zugabe der Rhizobien; die restlichen Pflanzen blieben für den Extrakt aus solchen ohne Knöllchen. Die Resultate für die Sproßextrakte sind in Tabelle 8 dargestellt, diejenigen für die Wurzelextrakte in Tabelle 9. Es erfolgte nur Steigerung der Knöllchenbildung, wenn an den für den Extrakt verwendeten Pflanzen Knöllchen vorhanden waren. Abbildung 2 veranschaulicht dieses Resultat.

Nach Untersuchungen von CHEN, NICOL und THORNTON (1941) begünstigen Extrakte aus Pflanzen mit aktiven Knöllchen die Vermehrung von *Rhizobium*, Extrakte aus Pflanzen mit inaktiven Knöllchen hemmen diese. CHEN (1938), GEORGI und BEGUIN (1939) und BIELER (1940) konnten Wachstumsstoffe in *Rhizobium*-Kulturen nachweisen. Nach den Untersuchungen von

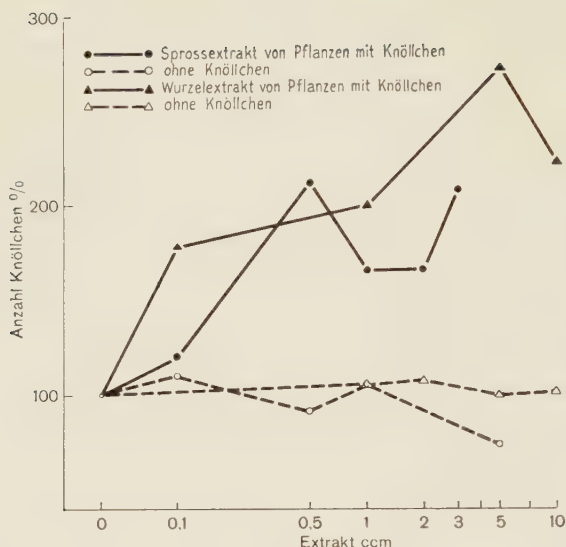


Abb. 2. Beeinflussung der Knöllchenbildung bei *Pisum sativum* L. durch Zugabe von Extrakt aus Erbsenpflanzen mit und ohne Knöllchen. Versuche 125, 126, 129 und 130. Anzahl Knöllchen der Kontrollpflanzen = 100 % gesetzt

LINK und EGGERS (1940) bewirken Bohnen- und Erbsenknöllchen Krümmung von *Avena*-Koleoptilen; Wurzeln, an denen die Knöllchen entfernt wurden, bewirken schwächere Krümmung, während diese bei Wurzeln ohne *Rhizobium* noch geringer ist. Nach diesen Untersuchungen und denen von BIELER (1940) sind also die Knöllchen am wuchsstoffreichsten. Diese höhere Wuchsstoffkonzentration mag ein Grund für die Förderung der Knöllchenbildung durch Extraktpflanzen mit Knöllchen sein, die bei Zugabe von Extrakt aus sterilen Pflanzen ausblieb.

II. Einfluß des Lichtes auf die Knöllchenbildung an Erbsenwurzeln

VIRTANEN (1938) beobachtete bei Steigerung der Kohlenhydratassimilation eine Erhöhung der N-Bindung; noch stärkere Steigerung hatte gegenteilige Wirkung: die N-Bindung wurde gehemmt, wobei es sogar zu N-Mangelerscheinungen kam. Um optimale N-Bindung zu erhalten, ist also ein bestimmtes Kohlenhydrat-Stickstoff-Verhältnis ausschlaggebend. Dieses Optimum ist abhängig von ganz bestimmter Belichtungsdauer und Belichtungsstärke (LEWIS, Mc COY 1933, VIRTANEN 1947). Während VIRTANEN seine Beobachtungen auf die N-Bindung bezog, fanden LEWIS und Mc COY (1933), daß die Knöllchenbildung außer von Durchlüftung, Feuchtigkeit und Temperatur ganz wesentlich von der Belichtung abhängt. Nähere Angaben über die Qualität des Lichtes finden sich nicht. Nach den genannten Autoren führt schwache Photosynthese, erreicht durch Wegnahme der Blätter, zu schwächerer Knöllchenbildung. Wie schon im vorhergehenden Abschnitt beschrieben wurde, konnte die Knöllchenbildung bei Erbsen durch Wegschneiden des Sprosses ganz unterdrückt werden (Versuch 13 und 21). Ein anderer Versuch ergab, daß zur Knöllchenbildung bei Erbsen mindestens vier Blätter vorhanden sein müssen; an einer gut ausgebildeten Erbsenpflanze sind nach etwa sieben Wochen neun Blätter entwickelt. Auch L. BOND (1948 a) fand, daß die Anzahl der Knöllchen je Einheit Wurzellänge größer ist bei Bedingungen, die für die Photosynthese günstig

sind. LEONARD (1928) beobachtete an *Soja* im Winter weniger und kleinere Knöllchen als bei günstiger Jahreszeit. Dasselbe konnte ich auch bei den eigenen Versuchen im Winter feststellen, wo von etwa Ende November bis gegen Ende Januar bei sonst gleichen Bedingungen gar keine oder nur wenig Knöllchen an Erbsenpflanzen entstanden. Eine Beobachtung PRAZMOWSKYS (1890), wonach Erbsenpflanzen im Dunkeln normal Knöllchen bilden, konnte nicht bestätigt werden. THORNTON (1930) fand an Luzernepflanzen, die im Dunkeln wuchsen, sehr wenig Knöllchen.

Alle diese Tatsachen weisen darauf hin, daß das Licht ein Umweltfaktor von ganz wesentlicher Bedeutung für die Knöllchenbildung ist. Obwohl das Licht an einem Standort von Leguminosen und Nicht-Leguminosen beiden Pflanzengruppen wohl in gleichem Maß zur Verfügung steht und demnach zur Erklärung der Sonderstellung der Leguminosen in bezug auf ihre Symbiose mit *Rhizobium* nichts beitragen wird, war es doch interessant, dieser Erscheinung weiter nachzugehen. Dabei soll der Einfluß des Lichtes auf den Sproß und auf die Wurzel getrennt betrachtet werden.

a) Knöllchenbildung bei Beeinflussung des Sprosses durch Licht und Dunkelheit

Kultivieren wir die Erbsenpflanzen im Licht, wie es im Abschnitt über die Methode beschrieben wurde, so werden die Pflanzen infiziert, und es werden Knöllchen gebildet; bringen wir aber die Erbsenpflanzen statt ins Licht ins Dunkle und lassen sie unter sonst gleichen Bedingungen wachsen, so bilden die Wurzeln *keine* Knöllchen (Versuch 13). Die etiolierten Pflanzen sind bleich, der ganze Sproß ist stark in die Länge gewachsen; er trägt kleine Blättchen, die gelb bleiben; das ganze Wurzelsystem dagegen ist völlig normal und gut ausgebildet. Die Ursache für das Ausbleiben der Knöllchenbildung liegt offenbar in den Erbsenpflanzen, denn die Bakterien wurden ja unter den gleichen Bedingungen kultiviert, in gleicher Menge zu den Pflanzen gegeben und sind dort ebenfalls im Dunkeln, wie bei der Kontrolle, wo ja nur der Sproß am Licht ist. Zwei Erklärungsmöglichkeiten scheinen gegeben: Die Bakterien dringen überhaupt nicht in die Wurzeln ein, oder es kommt trotz Infektion im Dunkeln nicht zur Ausbildung von Knöllchen. Entweder ist also die Einwirkung der Dunkelpflanze auf das umgebende Milieu verändert, oder die Pflanze verhält sich anders gegenüber den Bakterien in ihrem Innern.

Um über diese interessante Erscheinung mehr zu erfahren, wurden folgende Versuche unternommen (s. Abb. 3). Sechs Erbsenpflanzen wurden im Tageslicht aufgezogen und nach elf Tagen gleichzeitig mit der Zugabe von *Rhizobium* in die Dunkelkammer gebracht (Versuch 70); dort blieben sie noch während 30 Tagen. Trotz der anfänglichen Belichtung, während welcher die Sprosse etwa 12 cm lang und grün wurden, bildeten die Pflanzen im Dunkeln *keine*, die sechs Kontrollpflanzen am Licht aber normal Knöllchen.

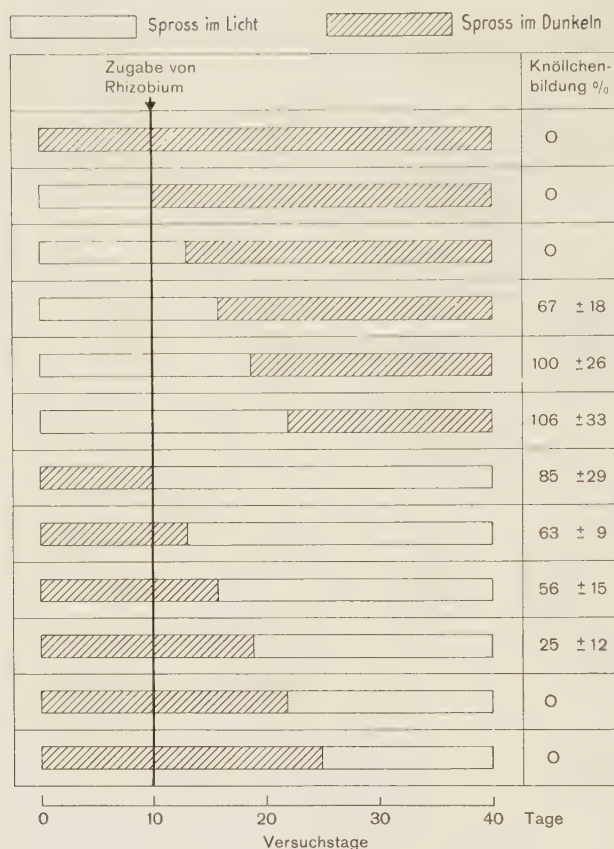


Tabelle 10

Versuch 120:

Abhängigkeit der Knöllchenbildung bei
Pisum sativum L. von der Dauer der
Lichtvorperiode

Versuchszeit: 15. April bis 25. Mai

Anzahl Pflanzen	Behandlung der Pflanzen nach der Zugabe von <i>Rhizobium</i>	Knöllchen je Pflanze
4	immer dunkel	0
11	3 Tage Licht	0
11	6 Tage Licht	89 ± 24
10	9 Tage Licht	132 ± 35
11	12 Tage Licht	141 ± 43
9	alle Tage im Licht	133 ± 28

Abb. 3. Schematische Darstellung der Versuche über die Knöllchenbildung an *Pisum sativum* L. bei verschiedenen Lichtverhältnissen. Wurzeln immer dunkel gehalten. Knöllchenbildung in Prozenten der Knöllchenbildung an Pflanzen, die während der ganzen Dauer des Versuches am Tageslicht unter natürlicher Tageslänge gehalten wurden (Frühjahrstage in Basel auf 47° 30' nördl. Breite)

In einem nächsten Versuch (Nr. 120) wurde die Belichtungsdauer verändert, indem Gruppen von je elf Erbsenpflanzen vor und bei der Zugabe der Rhizobien und zu verschiedenen Zeitpunkten nachher jeweils ins Dunkle gebracht wurden. Blieben die Pflanzen nur drei Tage nach der Bakterienzugabe am Licht, so kam es nicht zur

Knöllchenbildung, wohl dagegen nach sechs Tagen Licht. Je länger die Pflanzen nach dem Impfen am Licht blieben, um so mehr Knöllchen wurden gebildet (Tabelle 10). Dieses Ergebnis stimmt mit jenem von THORNTON (1930) überein: Luzernepflanzen, die

mit dem Setzen geimpft und dann ins Dunkle gebracht wurden, wenn die ersten Blätter entwickelt waren, bildeten Knöllchen, aber nur etwa ein Drittel soviel wie Pflanzen, die immer im Licht standen.

Die Versuche wurden weiter so variiert, daß sechs Pflanzen zuerst im Dunkeln gehalten und gleichzeitig mit der Zugabe der Rhizobien ans Licht gebracht wurden (Versuch 71). Sie bildeten annähernd gleich gut Knöllchen wie die immer am Licht gewesenen Kontrollpflanzen. Es erfolgt also keine dauernde Beeinflussung der Pflanzen im Dunkeln, solange diese noch nicht mit den Bakterien in Berührung kommen.

Wurden jedoch die Pflanzen während verschieden langer Zeit nach der Bakterienzugabe weiter im Dunkeln gehalten, so ergab sich, daß Pflanzen, die während zwölf Tagen nach dem Impfen noch im Dunkeln blieben und dann 17 Tage am Tageslicht wuchsen, keine Knöllchen mehr bildeten (Versuch 137, Tabelle 11). Daß die Bakterien während der Dunkelperiode etwa absterben, scheint unwahrscheinlich, was aus folgendem Versuch hervorgeht: eine erste Gruppe von zwölf Pflanzen, die gleichzeitig mit dem Setzen geimpft worden war, wurde ersetzt durch eine zweite in denselben Kolben mit ergänzter, verdünnter Nährlösung, aber ohne Bakterienzusatz; an den Wurzeln dieser zweiten Gruppe von Pflanzen entstanden noch Knöllchen. Es sei daran erinnert, daß bei diesen Versuchen die Wurzeln immer im Dunkeln waren. Aus diesen Dunkelversuchen ergibt sich,

Tabelle 11

Versuch 137:
Knöllchenbildung bei zeitweise
verdunkelten und belichteten
Erbsenpflanzen

Versuchszeit: 10. April bis 19. Mai (39 Tage)
Rhizobium-Zugabe am 11. Tage

Anzahl Pflanzen	Versuchspflanzen		Knöllchen je Pflanze
	im Dunkeln Tage	im Licht Tage	
8	0	39	164 ± 46
5	11	28	139 ± 48
5	14	25	103 ± 14
6	17	22	92 ± 25
9	20	19	41 ± 19
8	23	16	0
7	26	13	0
5	39	0	0

1. daß trotz einer kurzen Vorperiode im Licht — auch wenn diese noch einige Tage nach der Rhizobien-Zugabe andauert — bei einer Nachperiode im Dunkeln keine Knöllchen gebildet werden. Eine gewisse minimale Belichtungsdauer während der Anwesenheit der Bakterien ist notwendig zur Ausbildung von Knöllchen;
2. daß zu lange Vorperiode im Dunkeln die Knöllchenbildung verhindert, auch wenn anschließend eine Periode im Licht folgt, wo die Blätter ergrünen können, und zwar während einer Dauer (17 Tage), die größer ist als jene bei der Lichtvorperiode, die zur Knöllchenbildung ausreicht.

Daraus folgt, daß die Knöllchenbildung mehr oder weniger quantitativ von einem besonderen physiologischen Zustand (Wirkstoffe?) der Erbsenpflanze abhängt, der im Sproß nur bei genügend langer und zeitlich geeignet gelegener Belichtung auftritt.

b) Knöllchenbildung bei Belichtung der Wurzel

Unter unseren normalen Versuchsbedingungen (s. Methode) und in der Natur erfolgt die Knöllchenbildung an verdunkelten Wurzeln. Nachdem im

Tabelle 12

Versuch 11:
Einfluß der Belichtung der
Wurzeln auf die Knöllchen-
bildung bei *Pisum sativum* L.
Sproß belichtet, Gewächshaus; Temp. etwa 22° C.
Versuchszeit: 23. Februar bis 1. April

Anzahl Pflanzen	Wurzel	Knöllchen je Pflanze	t	P
6	verdunkelt	47 ± 30	—	—
6	belichtet	3 ± 4	3,31	0,01

Tabelle 13

Versuch 86:
Einfluß der täglichen Belich-
tungsdauer der Wurzeln auf die
Knöllchenbildung bei *Pisum*
sativum L.
Sproß belichtet, Gewächshaus; Temp. etwa 22° C.
Versuchszeit: 18. März bis 24. April

Anzahl Pflanzen	tägliche Belichtungsdauer Std.	Knöllchen je Pflanze	t	P
6	0	105 ± 36	—	—
6	1	94 ± 34	0,49	0,60
6	3	90 ± 29	0,72	0,50
6	6	60 ± 25	2,30	0,05
6	12	46 ± 23	3,01	0,01

Tabelle 14

Versuch 121:
Belichtung der Wurzel von *Pisum*
sativum L. mit blauem und rotem
Licht und normalem Tageslicht
Versuchszeit: 4. September bis 8. Oktober

Anzahl Pflanzen	Wurzeln im	Knöllchen je Pflanze	t	P
6	Dunkeln	41 ± 11	—	—
7	roten Licht	38 ± 15	0,39	0,70
6	blauen Licht	23 ± 12	2,43	0,05
6	Tageslicht	17 ± 16	2,79	0,02

vorhergehenden Abschnitt gezeigt wurde, daß der Sproß für die Knöllchenbildung belichtet werden muß, war es nun von Interesse, zu untersuchen, ob Verdunkelung der Wurzeln für die Knöllchenbildung etwa notwendig ist.

Ein erster Versuch, bei dem die Wurzeln nicht wie bei den Kontrollpflanzen durch Aluminiumfolie verdunkelt waren, ergab eine starke Herabsetzung der Knöllchenzahl, indem von acht Pflanzen sechs überhaupt keine und zwei nur einige wenige Knöllchen bildeten, die allerdings doch rot waren (Leghaemoglobin). Weitere Versuche ergaben nicht dieses extreme Resultat, doch wiesen die Pflanzen mit belichteten Wurzeln nur etwa $\frac{1}{15}$ soviel Knöllchen auf wie die verdunkelten Kontrollwurzeln (Tabelle 12). In einem weiteren Versuch wurde untersucht, ob die Knöllchenbildung etwa quantitativ mit der täglichen Belichtungsdauer der Wurzeln zusammenhänge; es ergab sich, daß die Hemmung der Knöllchenbildung um so größer war, je länger die Wurzeln täglich belichtet wurden (Tabelle 13).

Es erhebt sich die Frage, welcher Anteil des sichtbaren Lichtes eine solche Hemmung hervorruft. Die Versuchsgefäße wurden daher statt mit Aluminiumfolie, wie bei der Kontrolle, mit rotem und blauem

Cellophan (Firma Cellux, Rorschach) umhüllt, deren spektrale Transparenz mit einem Beckman-Spektrophotometer ausgemessen worden war. Die Folien waren so gewählt, daß der Wellenlängenbereich des durchgelassenen Lichtes möglichst klein blieb und für die beiden Folien möglichst auseinanderlag (Abb. 4). Für die blaue Folie traf dies zu, hingegen mußte die rote Folie hierzu mit einer gelben kombiniert werden. Der Versuch ergab erneut, daß Belichtung der Wurzeln mit Tageslicht die Knöllchenzahl an Erbsenpflanzen herabsetzt (Tabelle 14); dann zeigte sich aber weiter, daß blaues Licht ebenfalls stark hemmt, während im roten Licht etwa gleich viel Knöllchen gebildet werden wie bei verdunkelten Wurzeln. Somit ist klar, daß die hemmende Wirkung des Tageslichtes vom kurzwelligen Anteil des sichtbaren Lichtes ausgeht.

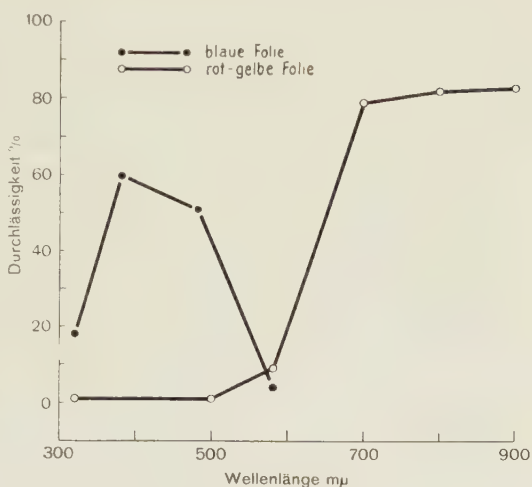


Abb. 4. Spektrale Durchlässigkeit von rot-gelber und blauer Cellophanfolie

Um zu sehen, welcher der beiden Symbionten durch die Belichtung eigentlich beeinflusst wird, wurde folgende Versuchsanordnung getroffen: Belichtung der Bakterien zehn Tage vor Zugabe zu verdunkelten Wurzeln und Belichtung der Wurzeln zehn Tage lang vor Zugabe von im Dunkeln kultivierten Bakterien; anschließend Wurzeln verdunkelt. Keine der beiden Behandlungen hatte einen Einfluß auf die Knöllchenbildung. Es kommt nur zu einer Hemmung, wenn beide Partner gleichzeitig belichtet werden. Dabei muß vorläufig offengelassen werden, in welche Phase der Infektion bzw. der Knöllchenbildung das kurzwellige Licht eingreift und welcher Art der Wirkungsmechanismus der Lichthemmung ist.

III. Morphologische Veränderung des Wurzelsystems bei der Knöllchenbildung

Vergleichen wir Wurzelsysteme von Erbsenpflanzen, die mit *Rhizobium* geimpft wurden, mit solchen, die ungeimpft blieben — beide Gruppen wurden auf stickstofffreier Nährlösung gezogen —, so fällt uns auf, daß die ungeimpften Wurzeln reichlicheres Wachstum zeigen; es werden längere oder mehr Wurzeln gebildet im Vergleich zum kleineren, gedrungeneren Wurzelsystem, an dem Knöllchen vorhanden sind (Abb. 5).

Schon VIRTANEN (1928) beobachtete kräftigere Wurzeln an Knöllchenpflanzen und feinfaserige Wurzeln an Pflanzen, die als Stickstoffquelle Ammoniumnitrat erhielten. NUTMAN (1948) zählte Seitenwurzeln an geimpften



Abb. 5. Unterschied zwischen Wurzelsystem mit Knöllchen (a) und ohne Knöllchen (b).
In beiden Fällen Kultur in stickstofffreier Nährlösung

und ungeimpften Rotkleepflanzen und fand bei geimpften Pflanzen weniger als bei ungeimpften, woraus er den Schluß zieht, daß Knöllchenbakterien im Substrat eine Hemmung auf die Seitenwurzelbildung ausüben. Das Verhältnis beträgt, aus Abbildung 2 seiner Arbeit entnommen, etwa fünf Seitenwurzeln an ungeimpften Pflanzen gegen vier Seitenwurzeln an geimpften Pflanzen.

Bei *Hedera* scheinen die Verhältnisse anders zu sein: BOULLARD (1954) beobachtete an Efeu-wurzeln um so reichlichere Verzweigung, je reichlicher die Infektion der Efeu-wurzeln mit ihrem Mykorrhizapilz war.

Um diesen Unterschied zwischen knöllchenfreiem und knöllchenhaltigem Wurzelwerk von *Pisum sativum* L. zu klären und darzustellen, führte ich den folgenden Versuch aus (Nr. 135): Erbsenpflanzen wurden in der üblichen Weise auf Nährlösung wachsen gelassen, die einen Pflanzen geimpft, die andern ohne Bakterien. In verschiedenen Zeitabständen, das erstemal vor dem Impfen, von da ab etwa alle sieben Tage, wurden acht Pflanzen aus jeder Gruppe untersucht. Die Auswertung umfaßte die Länge der Hauptwurzeln, Anzahl und Länge der Seitenwurzeln I., II. und III. Ordnung, das Trockengewicht des Sprosses und des Wurzelsystems und bei geimpften Pflanzen die Zahl der Knöllchen. Dabei ergab sich, wie Tabelle 15 zeigt, daß die Pflanzen mit Wurzelknöllchen, verglichen mit ungeimpften Pflanzen, kürzere Hauptwurzeln, weniger und kürzere Seitenwurzeln I. und II. Ordnung und bedeutend weniger Seitenwurzeln III. Ordnung hatten, sofern solche überhaupt entstanden.

Tabelle 15

Versuch 135: Wurzelwachstum bei mit *Rhizobium* geimpften und bei ungeimpften Pflanzen von *Pisum sativum* L.

Versuchszeit: 2. März bis 14. April

Gewächshaus: Temp. etwa 22° C. Impfen der Pflanzen am 9. Versuchstage

Alter der Pflanzen (Tage)	Zahl der Seitenwurzeln				Länge (mm)			
	Pflanzen		t	P	Pflanzen		t	P
	geimpft	ungeimpft			geimpft	ungeimpft		

a) Hauptwurzeln

8					197 ± 33	207 ± 16	0,71	0,5
15					259 ± 43	293 ± 71	1,08	0,3
22					318 ± 49	416 ± 84	2,23	0,05
28	—	—	—	—	276 ± 27	480 ± 70	6,58	0,001
35					308 ± 61	448 ± 56	4,16	0,01
41					315 ± 71	478 ± 53	4,86	0,001

b) Seitenwurzeln I. Ordnung

8	44 ± 7	41 ± 4	1,00	0,4	49 ± 17	51 ± 6	0,28	0,8
15	59 ± 6	61 ± 7	0,57	0,6	53 ± 7	66 ± 15	2,00	0,1
22	61 ± 8	75 ± 12	2,19	0,05	55 ± 9	72 ± 14	2,25	0,05
28	68 ± 10	90 ± 9	3,93	0,01	51 ± 3	63 ± 11	2,68	0,02
35	70 ± 8	93 ± 16	3,10	0,01	53 ± 7	71 ± 9	4,24	0,001
41	70 ± 7	101 ± 15	4,75	0,001	53 ± 6	59 ± 8	1,50	0,2

c) Seitenwurzeln II. Ordnung

8	17 ± 24	15 ± 17	0,18	0,9	—	—	—	—
15	150 ± 73	141 ± 89	0,30	0,8	—	—	—	—
22	167 ± 29	207 ± 126	0,69	0,5	21 ± 5	31 ± 11	1,95	0,1
28	190 ± 45	337 ± 70	4,17	0,01	17 ± 3	23 ± 5	2,68	0,02
35	181 ± 41	356 ± 98	4,02	0,01	17 ± 4	22 ± 5	1,89	0,1
41	217 ± 40	387 ± 68	4,93	0,001	16 ± 3	22 ± 4	3,43	0,01

d) Seitenwurzeln III. Ordnung

22	3 ± 8	17 ± 35	0,93	0,4				
28	2 ± 1	75 ± 75	2,35	0,05				
35	4 ± 6	53 ± 61	1,96	0,1	—	—	—	—
41	3 ± 4	93 ± 41	5,63	0,001				

Das Trockengewicht (Tabelle 16) der Wurzeln war etwa gleich bei ungeimpften und bei geimpften einschließlich Knöllchen. Bei den geimpften Pflanzen des 35. und 41. Versuchstages wurden die Knöllchen von den Wurzeln abgetrennt und gesondert gewogen. Nun wirkte sich die geringere Anzahl und Länge der Seitenwurzeln der geimpften Pflanzen auch auf das Trockengewicht aus, indem dieses gegenüber den ungeimpften Pflanzen kleiner war. Zugleich zeigte sich auch, welch großen Anteil die Knöllchen an der ganzen Wurzelmasse ausmachen, indem das Verhältnis von Knöllchen zu Wurzeln 0,8 : 1 war.

Tabelle 16

Versuch 135: Trockengewichte in mg von mit *Rhizobium* geimpften und von ungeimpften Pflanzen von *Pisum sativum* L.
Bedingungen wie in Tabelle 15

Alter der Pflanzen (Tage)	Wurzel				Sproß			
	geimpft	ungeimpft	t	P	geimpft	ungeimpft	t	P
8	39 ± 4	38 ± 5	0,40	0,7	70 ± 9	79 ± 9	1,80	0,1
15	65 ± 17	60 ± 16	0,56	0,6	157 ± 35	145 ± 38	0,62	0,6
22	86 ± 11	91 ± 25	0,48	0,7	253 ± 28	242 ± 56	0,46	0,7
28	116 ± 6	106 ± 10	2,14	0,05	365 ± 31	304 ± 36	3,26	0,01
35	120 ± 10 ¹⁾	130 ± 15	1,43	0,2	435 ± 40	404 ± 72	1,00	0,4
41	113 ± 9 ¹⁾	133 ± 15	3,23	0,01	489 ± 48	373 ± 45	4,64	0,001

1) Trockengewicht der Wurzeln ohne Knöllchen (mg):

35. Tag: 67 ± 7, 41. Tag: 60 ± 7.

Trockengewicht der Knöllchen:

35. Tag: 53 ± 10, 41. Tag: 53 ± 5.

Das Trockengewicht der Sprosse (Tabelle 16) von geimpften Pflanzen war größer als jenes ungeimpfter, was wohl auf bessere Stickstoffversorgung geimpfter Pflanzen zurückgeführt werden darf. Die ungeimpften Pflanzen sind dagegen nur auf den Stickstoffvorrat im Erbsensamen angewiesen. Trotz des kleineren Wurzelsystems entwickeln sich also die Sprosse der Erbsenpflanzen mit Knöllchen besser als die sterilen.

Eine Erklärung für diesen Unterschied in der Ausbildung des Wurzelsystems finden wir im Trockengewicht der Wurzeln: die geimpfte Wurzel besitzt etwa das gleiche Trockengewicht wie die ungeimpfte; sie muß aber sowohl das eigentliche Wurzelsystem als auch die Knöllchen aufbauen, was in erster Linie auf Kosten der Zahl gebildeter Seitenwurzeln und weniger auf Kosten ihrer Länge geschieht. Nach NUTMAN (1948) haben Knöllchen und Seitenwurzeln denselben Ursprung. Es wäre denkbar, daß die Knöllchen an den Stellen der Wurzeln entstehen, wo bei den ungeimpften die Seitenwurzeln auswachsen. Dann müßte die Summe der Anzahl Knöllchen und Anzahl Seitenwurzeln bei geimpften Pflanzen gleich groß sein wie die Summe der Seitenwurzeln bei den ungeimpften Pflanzen. Wie Tabelle 17 zeigt, trifft dies aber nicht zu; die Summe bei den geimpften Pflanzen ist oft kleiner als bei den ungeimpften. Durch die Knöllchen erfolgt also eine Hemmung der Ausbildung von Seitenwurzeln. Dasselbe konnte NUTMAN (1952) an Rotklee feststellen, indem er durch Wegnahme von Knöllchen eine Förderung der Seitenwurzelbildung erreichte. Daneben besteht aber auch noch eine Hemmung des Längenwachstums der Wurzeln durch die Knöllchen. Diese kommt vor allem eindeutig beim Wachstum der Hauptwurzel zum Ausdruck. Auch bei den Seitenwurzeln scheint diese Hemmung vorhanden, erreicht aber nicht immer die nötige Eindeutigkeit.

Wenn wir Abbildung 5 ansehen, so fällt auf, daß alle Knöllchen auf einem Kreis liegen, alle sind ungefähr gleich weit vom Samen entfernt. Daraus dürfen wir wohl schließen, daß die Knöllchenbildung in einem bestimmten Entwicklungszustand der Wurzel einsetzt, an allen Wurzelverzweigungen im gleichen Zeitabstand nach der Impfung. Nach der Knöllchenbildung kommt es nur noch zu sehr geringem Wurzelwachstum. Wenn wir uns die beiden Wurzelsysteme a) und b) aufeinandergelegt denken und vergleichen, so zeigt sich bis zur Zone der Knöllchenbildung

kein wesentlicher Unterschied. Dieser wird erst deutlich außerhalb der Knöllchenzone: die sterile Wurzel wächst gleichförmig weiter und bildet Seitenwurzeln höherer Ordnung aus, während dies bei den infizierten Wurzeln fast ganz unterbleibt; so mag sich die größere Anzahl Seitenwurzeln bei den sterilen Wurzeln erklären. Es handelt sich also um eine Hemmung sowohl des Längenwachstums der Haupt- und Seitenwurzeln als auch der Ausbildung neuer Seitenwurzeln nach der Knöllchenbildung, wie sie in Abbildung 5 deutlich zum Ausdruck kommt.

Tabelle 17

Vergleich der Anzahl der Seitenwurzeln I., II. und III. Ordnung bei sterilen Pflanzen mit der Anzahl der Seitenwurzeln derselben Ordnungen und der Knöllchen bei geimpften Pflanzen

Alter in Tagen der Pflanzen	Anzahl Organe an	
	sterilen Pflanzen	geimpften Pflanzen
15	202	242
22	299	330
28	502	357
35	502	381
41	581	402

Zusammenfassung

1. Zur Untersuchung der Beziehungen zwischen *Pisum sativum* und *Rhizobium* erfolgte die Aufzucht von *Pisum*, die Kultur der Bakterien und deren Zugabe zu den Erbsen unter aseptischen Bedingungen.

2. Es wurde der Einfluß von Pflanzenextrakten, von Licht und Dunkelheit auf die Knöllchenbildung an *Pisum sativum* L., Sorte „Senator“, ferner die morphologische Veränderung des Wurzelsystems durch die Knöllchenbildung untersucht.

3. Wurzeln ohne Sproß (in Organkultur) bilden keine Knöllchen; auch nicht bei Zugabe von ganzen Sprossen oder deren Extrakt.

4. Wässriger Erbsen s p r o ß extrakt, zu ganzen, grünen Erbsenpflanzen gegeben, fördert die Knöllchenbildung; der wirksame Stoff (Stoffgemisch) ist weder hitze- noch säurebeständig. Entsprechender Extrakt aus Erbsenwurzeln fördert die Knöllchenbildung ebenfalls. Voraussetzung in beiden Fällen ist allerdings, daß der Extrakt jeweils aus Pflanzen mit Knöllchen stammt; Extrakt aus sterilen Pflanzen hatte keinen Einfluß.

5. Auch wässriger Extrakt aus Sprossen und Wurzeln von *Zea Mays* hatte einen fördernden Einfluß auf die Knöllchenbildung; es kann sich also nicht um wirksame Stoffe handeln, die für Leguminosen spezifisch sind.

6. An Dunkelpflanzen von *Pisum sativum* L. werden keine Knöllchen gebildet. Auch an Pflanzen, die zwar bis zur Zugabe der Rhizobien am Licht wachsen und ergrünen, dann aber ins Dunkle gebracht werden, kommt es nicht zur Knöllchenbildung.

7. Je länger die Pflanzen nach der Bakterien-Zugabe am Tageslicht blieben (3, 6, 9, 12 Tage), um so mehr Knöllchen wurden gebildet.

8. Erbsenpflanzen, die zuerst im Dunkeln wachsen und dann im Licht, bilden keine Knöllchen, wenn die Dunkelperiode länger als zehn Tage dauert; je kürzer dagegen diese Periode ist, um so mehr Knöllchen werden gebildet. Daraus folgt, daß die Knöllchenbildung offenbar quantitativ von einem Stoff (oder Stoffgemisch) abhängt, der nur im belichteten Sproß bei genügend langer, zeitlich günstiger Belichtung in geeigneter Konzentration entsteht.

9. Bei Erbsenpflanzen mit belichtetem Sproß hemmt Belichtung der Wurzel die Knöllchenbildung, und zwar ist die Hemmung um so größer, je länger die tägliche Belichtung der Wurzel dauert.

Blaues Licht hat dabei die gleiche hemmende Wirkung wie Tageslicht; rotes Licht dagegen hemmt die Knöllchenbildung nicht.

Weder Belichtung der *Rhizobium*-Kulturen allein noch der Erbsenwurzeln allein vor Zugabe der Bakterien hatte einen Einfluß auf die Knöllchenbildung, die hemmende Wirkung des Lichtes wird nur bei gleichzeitiger Anwesenheit beider Symbionten manifest.

10. Bei der Knöllchenbildung erfolgt eine Veränderung der Gestalt des Wurzelsystems. Messungen ergaben, daß die Hauptwurzel, die Seitenwurzeln I., II. und III. Ordnung bei knöllchentragenden Pflanzen kürzer sind als bei sterilen, ebenso werden weniger Seitenwurzeln I., II. und III. Ordnung ausgebildet als an sterilen. Das Trockengewicht der Wurzeln mit Knöllchen ist annähernd gleich wie bei den sterilen, während dasjenige der Sprosse von knöllchentragenden Pflanzen höher ist als dasjenige der sterilen.

Literaturverzeichnis

- BHADURI, S. N., 1951: Influence of the numbers of the *Rhizobium* supplied on the subsequent nodulation of the legume host plant. Ann. Bot. N. S. 15, 209—217.
- BIELER, G., 1940: Influence du *Rhizobium* sur la croissance des racines de cresson. C. R. des séances de la soc. de phys. et d'hist. nat. de Genève 57, 30—32.
- BOND, G., 1950: Symbiosis of leguminous plants and nodule bacteria. III. Observations on the growth of soybean in water culture. Ann. Bot. N. S. 14, 245—261.
- BOND, L., 1948 a: Origin and developmental morphology of root nodules of *Pisum sativum*. Bot. Gaz. 109, 411—434.
- —, 1948 b: Responses of Pea roots to application of certain growth-regulating substances. Bot. Gaz. 109, 435—447.

- BONNER, J. and ADDICOTT, F., 1937: Cultivation in vitro of excised Pea roots. Bot. Gaz. 99, 144—170.
- BOULLARD, B., 1954: L'influence mykorrhizienne expérimentale des plantules d'*Hedera Helix* L. Rapports et communications du huitième congrès intern. d. bot. Paris, section 13, 134—135.
- BREED, R. S., MURRAY, E. G. D. and HITCHENS, A. P., 1948: Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. 6. Aufl. Baltimore.
- BURLET, E., 1940: Über die pflanzliche Organkultur und ihre Anwendung bei physiologischen Untersuchungen. Ber. Schw. Bot. Ges. 50, 519—544.
- CHEN, H. K., 1938: Production of growth-substance by clover nodule bacteria. Nature 142, 753.
- —, NICOL, H. and THORNTON, H. G., 1941: Nodule bacteria and their hosts. Nature 147, 210.
- DIENER, T., 1950: Über die Bedingungen der Wurzelknöllchenbildung bei *Pisum sativum* L. Phytopath. Z. 16, 129—170.
- FISHER, R. A. and YATES, F., 1953: Statistical tables for biological, agricultural and medical research. 4. Aufl. London.
- GÄUMANN, E., JAAG, O. und ROTH, S., 1945: Über einen Immunisierungsversuch mit Wurzelknöllchenbakterien bei Leguminosen. Ber. Schw. Bot. Ges. 55, 270—277.
- GEIGER-HUBER, M. und BURLET, E., 1936: Über den hormonalen Einfluß der β -Indolyl-essigsäure auf das Wachstum isolierter Wurzeln in keimfreier Organkultur. Jb. wiss. Bot. 84, 233—253.
- GEORGI, C. E. and BEGUIN, A. E., 1939: Heteroauxin production by efficient and inefficient strains of *Rhizobia*. Nature 143, 25.
- LEONARD, L. T., 1926: A preliminary note on the relation of photosynthetic carbohydrate to nodule formation on soybeans. J. Amer. Soc. Agron. 18, 1012—1016.
- LEWIS, K. H. and MCCOY, E., 1933: Root nodule formation on the garden bean, studied by a technique of tissue culture. Bot. Gaz. 95, 316—329.
- LINK, G. K. K. and EGGERS, V., 1940: Avena coleoptile assay of ether extracts of nodules and roots of Bean, Soybean and Pea. Bot. Gaz. 101, 650—657.
- LUDWIG, C. A. and ALLISON, F. E., 1937: Experiments concerning diffusion of nitrogenous compounds from healthy legume nodules or roots. Bot. Gaz. 98, 680—695.
- NOBBE, F. und HILINER, L., 1899: Über die Wirkung der Leguminosenknöllchen in der Wasserkultur. Die landw. Vers.stationen 52, 455—467.
- NUTMAN, P. S., 1948: Physiological studies on nodule formation. I. The relation between nodulation and lateral root formation in red clover. Ann. Bot. N. S. 12, 81—96.
- —, 1952: Studies on the physiology of nodule formation. III. Experiments on the excision of root-typs and nodules. Ann. Bot. N. S. 16, 79—101.
- PIETZ, J., 1938: Beitrag zur Physiologie des Wurzelknöllchenbakteriums. Zbl. Bakt. 2. Abt. 99, 1—32.
- PRAZMOWSKY, A., 1890: Die Wurzelknöllchen der Erbse. Ätiologie und Entwicklungsgeschichte. Die landw. Vers.stationen 37, 161—238.
- SMITH, J. D., 1949: Haemoglobin and the oxygen uptake of leguminous root nodules. The Biochem. J. 44, 585—591.
- STOLP, H., 1952: Beiträge zur Frage der Beziehungen zwischen Mikroorganismen und höheren Pflanzen. Arch. f. Mikrobiol. 17, 1—29.
- THIMANN, K. V., 1936: On the physiology of the formation of nodules on legume roots. Proc. Nat. Acad. Sci. 22, 511—514.
- THORNTON, H. G., 1929: The rôle of the young Lucerne plant in determining the infection of the root by the nodule-forming bacteria. Proc. Roy. Soc. London B 104, 481—492.
- —, 1930: The influence of the host plant in inducing parasitism in lucerne and clover nodules. Proc. Roy. Soc. London B 106, 110—122.

- VIRTANEN, A. I., 1928: Über die Einwirkung der Bodenazidität auf das Wachstum und die Zusammensetzung der Leguminosenpflanzen. *Biochem. Z.* **193**, 300—312.
- —, 1938: *Cattle Fodder and Human Nutrition*. Cambridge.
- —, 1947: The biology and chemistry of nitrogen fixation by legume bacteria. *Biol. Rev.* **22**, 239—269.
- — und HAUSEN, S. VON, 1931: Untersuchungen über die Leguminosenbakterien und -pflanzen. IX. Die Ausnutzung verschiedener Stickstoffverbindungen sowie des in Wurzelknöllchen gesammelten Stickstoffes durch Leguminosenpflanzen. *Biochem. Z.* **232**, 1—14.
- —, — — und KARSTRÖM, H., 1933: Untersuchungen über die Leguminosenbakterien und -pflanzen. XII. Die Ausnutzung der aus den Wurzelknöllchen der Leguminosen herausdiffundierten Stickstoffverbindungen durch Nichtleguminosen. *Biochem. Z.* **258**, 106—117.
- —, JORMA, J., LINKOLA, H. and LINNASALMI, A., 1947: On the relation between nitrogen fixation and leghaemoglobin content of leguminous root nodules. *Acta Chem. Scand.* **1**, 90—111.
- WEST, P. M. and WILSON, P. W., 1940: Biotin as a growth stimulant for the root nodule bacteria. *Enzymologia* **8**, 152—162.

Die vorliegende Arbeit wurde im Botanischen Institut der Universität Basel auf Anregung und unter Leitung von Herrn Prof. Dr. M. GEIGER-HUBER ausgeführt. Es ist mir eine angenehme Pflicht, Herrn Prof. Dr. M. GEIGER-HUBER für sein Interesse, die vielen Anregungen sowie dafür zu danken, daß er mir ständig Laborantinnen als Hilfskräfte zur Verfügung stellte. Ebenso danke ich Herrn E. SPAAR, dem früheren Abwart des Institutes, für manche technische Hilfeleistung, Herrn J. J. SCHNEIDER, Graphiker in Basel, für das Zeichnen der graphischen Darstellungen

Curriculum vitae

Ich, Peter Emanuel Rudin, wurde am 29. Januar 1927 als Sohn des Eduard Emanuel Rudin †, Dr. phil., Zoologe, von Basel und Muttenz (BL), und der Gertrud, geb. Krasting, in Basel geboren. Ich besuchte in Basel die Primarschule und das mathematisch-naturwissenschaftliche Gymnasium, wo ich 1947 die Maturitätsprüfung (Typus C) bestand. Im Sommersemester 1947 immatrikulierte ich mich an der philosophisch-naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität Basel, wo ich mich besonders dem Studium der biologischen und chemischen Fächer widmete. Nach Bestehen der Nebenfachexamina in Chemie, Hygiene-Bakteriologie und Zoologie begann ich meine Dissertation unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. M. GEIGER-HUBER. Meine Studien schloß ich im Sommer 1955 ab. Vom April 1952 bis zum Oktober 1953 hatte ich die Stelle des III. und vom 1. Dezember 1953 an die Stelle des I. Assistenten an der Botanischen Anstalt der Universität Basel inne. Während meiner Studienzeit besuchte ich die Vorlesungen und Kurse folgender Herren Professoren und Dozenten: E. BATSCHLET, H. ERLENMEYER, M. GEIGER-HUBER, R. GEIGY, E. HANDSCHIN, H. HEDIGER, E. HEITZ, P. HUBER, E. LUDWIG, H. MISLIN, H. NÜESCH, A. PORTMANN, T. REICHSTEIN, O. SCHÜEPP, J. TOMCSIK, W. VISCHER. Allen meinen verehrten Lehrern spreche ich an dieser Stelle meinen aufrichtigen Dank aus.